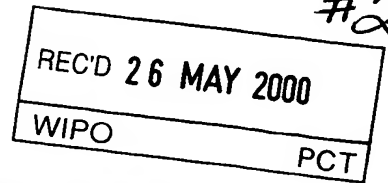


JP00/021

PCT/JP00/02112
10/019409
31.03.00
#2

日本国特許庁
PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT



別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて
いる事項と同一であることを証明する。

ESU

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed
with this Office.

出願年月日
Date of Application:

1999年 6月29日

出願番号
Application Number:

平成11年特許願第183664号

出願人
Applicant(s):

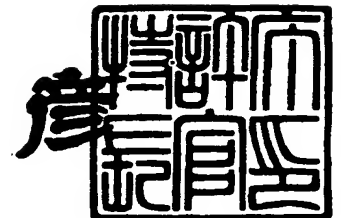
工業技術院長

PRIORITY
DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年 5月12日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

近藤 隆彦



出証番号 出証特2000-3035034

【書類名】 特許願

【整理番号】 11900279

【提出日】 平成11年 6月29日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C07K 14/00

【発明者】

 【住所又は居所】 茨城県つくば市東1丁目1番3 工業技術院生命工学工業技術研究所内

 【氏名】 巖倉 正寛

【特許出願人】

 【識別番号】 000001144

 【氏名又は名称】 工業技術院長 佐藤 壮郎

【指定代理人】

 【識別番号】 220000404

 【氏名又は名称】 工業技術院生命工学工業技術研究所長 大箸 信一

 【電話番号】 0298-54-2175

 【代理関係の特記事項】 特許出願人 工業技術院長の指定代理人

【提出物件の目録】

 【物件名】 明細書 1

 【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 硫黄原子を含まない酵素蛋白質

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 L-アラニン、L-アスパラギン酸、L-グルタミン酸、L-フェニルアラニン、L-グリシン、L-ヒスチジン、L-イソロイシン、L-リジン、L-ロイシン、L-アスパラギン、L-プロリン、L-グルタミン、L-アルギニン、L-セリン、L-トレオニン、L-バリン、L-チロシン、及びL-トリプトファンの 18 種類のL-アミノ酸残基から構成される硫黄原子を含まない酵素蛋白質。

【請求項 2】 L-アラニン、L-アスパラギン酸、L-グルタミン酸、L-フェニルアラニン、L-グリシン、L-ヒスチジン、L-イソロイシン、L-リジン、L-ロイシン、L-アスパラギン、L-プロリン、L-グルタミン、L-アルギニン、L-セリン、L-トレオニン、L-バリン、L-チロシン、L-トリプトファン、L-システイン、及びL-メチオニンの 20 種類のL-アミノ酸残基から構成される酵素蛋白質のL-システイン及びL-メチオニン残基をL-アラニン、L-アスパラギン酸、L-グルタミン酸、L-フェニルアラニン、L-グリシン、L-ヒスチジン、L-イソロイシン、L-リジン、L-ロイシン、L-アスパラギン、L-プロリン、L-グルタミン、L-アルギニン、L-セリン、L-トレオニン、L-バリン、L-チロシン、及びL-トリプトファンの 18 種類のL-アミノ酸残基に置換した、元の酵素蛋白質の活性を保持し耐酸化性を有する請求項 1 に記載の硫黄原子を含まない酵素蛋白質。

【請求項 3】 アミノ酸置換が合成DNAを使用した部位特異的変異法により行われたものである請求項 2 に記載の硫黄原子を含まない酵素蛋白質。

【請求項 4】 酵素活性が酸化還元活性、もしくは加水分解活性の機能を有することを特徴とする請求項 1 ～ 3 に記載の硫黄原子を含まない酵素蛋白質。

【請求項 5】 ジヒドロ葉酸還元酵素活性を保持し耐酸化性を有することを特徴とする請求項 1 ～ 4 に記載の硫黄原子を含まない酵素蛋白質。

【請求項 6】 キシラナーゼの活性を保持し耐酸化性を有することを特徴とする請求項 1 ～ 4 に記載の硫黄原子を含まない酵素蛋白質。

【請求項 7】 次の工程からなる組み合わせ変異による硫黄原子を含まない酵素蛋白質の製造方法。

(1) 硫黄原子を含むアミノ酸（含硫アミノ酸）の配列上の位置が A_i ($i = 1 \sim n$) である、 n 個の含硫アミノ酸を含む全長 m 個のアミノ酸よりなる酵素蛋白質をコードする DNA 配列の L-メチオニンをコードする開始コドン、L-メチオニン-L-アラニン、L-メチオニン-L-セリン又は L-メチオニン-L-プロリンのコドンで置換した変異体遺伝子を作成し、これを宿主細胞で発現して得られた変異体酵素蛋白質の酵素活性を測定し、最も活性が高いものを選び得られる置換変異体を A_1/MA_1 とする、

(2) その他の部位の A_i ($i = 2 \sim n$) の含硫アミノ酸をコードするコドン、請求項 1 に記載の 18 種類の他のアミノ酸をコードするコドンで置換した変異遺伝子を作成し、これを宿主細胞で発現して得られた変異体酵素蛋白質の酵素活性を測定し、酵素活性を示す p 個の変異体酵素蛋白質を選び得られる置換変異体を A_i/B_{ij} ($j = 1 \sim p$) とする、

(3) 置換変異体のうち活性の高いものから最大 3 個の置換変異体 A_i/B_{i1} 、 A_i/B_{i2} 及び A_i/B_{i3} を選択するが、ここで置換変異体は $A_i/B_{i1} > A_i/B_{i2} > A_i/B_{i3} > \dots > A_i/B_{ip}$ の順に活性が小さくなるものとする、

(4) 全ての部位 A_i ($i = 2 \sim n$) の含硫アミノ酸について、(2)、(3) と同様にして活性を有する置換変異体を選択し、それらの変異体と A_1/MA_1 の変異体を全て組み合わせた最大 $3 \times (n-1)$ 個の変異体を作成し、それらの酵素活性を測定して元の酵素蛋白質と同等以上の活性を有する変異体酵素蛋白質を作成する。

【請求項 8】 次の工程からなる段階的変異による硫黄原子を含まない酵素蛋白質の製造方法。

(1) 硫黄原子を含むアミノ酸（含硫アミノ酸）の配列上の位置が A_i ($i = 1 \sim n$) である、 n 個の含硫アミノ酸を含む全長 m 個のアミノ酸よりなる酵素蛋白質をコードする DNA 配列の L-メチオニンをコードする開始コドン、L-メチオニン-L-アラニン、L-メチオニン-L-セリン又は L-メチオニン-L-プロリンのコドンで置換した変異体遺伝子を作成し、これを宿主細胞で発現して得られた変異体酵素蛋白質の酵素活性を測定し、最も活性が高いものを選び得

られる置換変異体を A1/MA1 とする、

(2) A1/MA1 変異体の A2 の含硫アミノ酸をコードするコドンで置換した変異遺伝子を作成し、これを宿主細胞で発現して得られた 2 重変異体酵素蛋白質の酵素活性を測定し、活性の高いものから最大 3 個の 3 重変異体を選ぶ、

(3) 得られた 2 重変異体のそれぞれの A3 の含硫アミノ酸をコードするコドンで置換した変異遺伝子を作成し、これを宿主細胞で発現して得られた 3 重変異体酵素蛋白質の酵素活性を測定し、活性の高いものから最大 3 個の 3 重変異体を選ぶ、

(4) 以下同様に、4 重、・・・、n 重変異体を作成し、最後の n 重変異体の酵素活性を調べ、元の酵素の活性と同等以上の活性を有する変異体酵素蛋白質を作成する。

【請求項 9】段階的に変異する部位の順番が、A1、A2、・・・、An の順列組み合わせの種類 (n! 通り) のうちどれか一つであることを特徴とする請求項 8 に記載の段階的変異による硫黄原子を含まない酵素蛋白質の製造方法。

【請求項 10】含硫アミノ酸の配列上の位置が Ai (i = 1 ~ n) である、n 個の含硫アミノ酸を含む全長 m 個のアミノ酸よりなる酵素蛋白質において、k 個の部位に関しては請求項 7 に記載の方法を行い、残りの n - k 個の部位に関しては請求項 9 に記載の方法を行うことを特徴とする硫黄原子を含まない酵素蛋白質の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、硫黄原子を含まない酵素蛋白質に関する。

【0002】

【従来の技術及び発明が解決しようとする課題】

酵素は、その基質特異性が非常に高いためバイオセンサー等の分析機器開発、バイオリアクターなどのファインケミカル産業、また、特定汚染物質の分解除去など利用が試みられ、また期待されている。

【0003】

近年の質量分析装置の発達により、蛋白質の質量分析ができるようになってきた。蛋白質の質量数を質量分析により求めると、蛋白質として高度に精製された蛋白質でもアミノ酸配列から予想される質量数以外の質量数を示すものの混在が見いだされる様になってきた。参考例に示すように、L-システインを含まないジヒドロ葉酸還元酵素を用いて詳しく調べたところ、質量数変化は、質量数16を単位とするものであり、メチオニンの酸化がその主な原因である。

【0004】

酵素の利用を考える場合、酸化による蛋白質の変質は大きな障害となる。例えば、多くのバイオセンサーは電極反応を利用するが、その際過酸化水素等の酸化物が電極反応により生成し、これは酵素を酸化しセンサー全体の劣化を早めたり、信頼性を失わせたりする可能性が考えられるからである。また、長期間溶液中で酵素を利用する場合も水溶液中の酸素による酸化を防ぐことは困難もしくはコスト的に問題となるであろう。

【0005】

蛋白質を構成する原子は、水素(H)、炭素(C)、窒素(N)、酸素(O)、及び硫黄(S)の5種類である。このうち、硫黄原子は他の原子に比べて電子価特性等反応性の強い原子である。

【0006】

生物が作る蛋白質は、遺伝子であるDNA中にトリプレットコドンで暗号化されているL-アラニン、L-アスパラギン酸、L-グルタミン酸、L-フェニルアラニン、L-グリシン、L-ヒスチジン、L-イソロイシン、L-リジン、L-ロイシン、L-アスパラギン、L-プロリン、L-グルタミン、L-アルギニン、L-セリン、L-トレオニン、L-バリン、L-チロシン、L-トリプトファン、L-システイン、及びL-メチオニンの20種類のL-アミノ酸残基から構成される。このうち、含硫アミノ酸は、L-システイン及びL-メチオニンである。

【0007】

L-システインの硫黄原子は、チオール(-SH)基として存在する。チオール基は非常に反応性が高く、酸素、過酸化水素により容易に酸化されて、ジスルフィド

さらにスルフィン酸を生成する。

【0008】

L-メチオニンの硫黄原子は、チオエーテル(-S-CH₃)基として存在する。チオエーテル基は、チオール基ほど反応性は強くないが、過酸化水素により容易に酸化されてメチオニンスルフォキシドが生成する。

このことは、L-システイン及びL-メチオニン、即ち含硫アミノ酸を含まない酵素は、抗酸化特性を有することを示唆している。

【0009】

L-システイン及びL-メチオニンに対応するコドンは、TGTとTGC (L-システイン) 及びATG (L-メチオニン) の3種類である。一方、硫黄を含まないその他18種のL-アミノ酸に対応するコドンは、58種類である。従って、平均すると蛋白質は、20アミノ酸に1個の割合(3/61)で、L-システインもしくはL-メチオニンを含むことになる。このことは、100アミノ酸以上で構成される蛋白質は、非常に高い確率でL-システインもしくはL-メチオニンを含んでいることを意味する。実際、これまで報告された蛋白質のうちで触媒機能を有する酵素を調べてみると、L-システイン及びL-メチオニンを全く含まないものは見あたらない。

即ち、生物が作る酵素は全て含硫アミノ酸を含んでいるのである。

【0010】

ところが、近年の遺伝子操作を背景とする蛋白質変異の結果は、少なくとも一箇所の変異であれば、元の酵素機能を失わせることなく含硫アミノ酸を他のアミノ酸に置換することが可能であることを明らかにしてきている。ただ、本発明が完成された以前においては、全ての含硫アミノ酸を他のアミノ酸に置換した酵素が元の機能と同等の活性を示すか否かに関しては明らかとなっていなかった。むしろ、酵素活性の発現には、含硫アミノ酸の存在が必須であるとの考え方が支配的であった。

【0011】

このことから、次の相反する2つ可能性が考えられる。

第1の可能性は、生物がその生命維持に必要とするために必要な非常に高い酵素活性を発現するためには、含硫アミノ酸の存在が必須である。

第2の可能性は、非常に高い酵素活性を発現するためには、含硫アミノ酸の存在は必ずしも必要としないが、生命の起源の過程においてたまたま硫黄原子含んだ形で蛋白質を利用し且つ遺伝子のコード形態を確立させたため、生物が作る酵素はコドン使用頻度の割合に対応して含硫アミノ酸を含んでいる。従って、全ての含硫アミノ酸を他のアミノ酸に置換し、生物が作る含硫アミノ酸を含む酵素と同等の機能を有する酵素を作ることが可能である。

【0012】

もし、第2の可能性が正しければ、生物由来の含硫アミノ酸を含む酵素の全ての含硫アミノ酸を他のアミノ酸に置換することにより、抗酸化特性を有する酵素を製造する一般的な方法を開発できることになる。

本発明者らは、鋭意研究を重ね、生物由来の含硫アミノ酸を含む酵素の全ての含硫アミノ酸を他のアミノ酸に置換しても、元の酵素と同程度もしくはそれ以上の酵素活性を示す酵素が製造できることを実証するとともに、生物由来の野性型酵素から含硫アミノ酸を含まない酵素への変異戦略を確立し、本発明を完成させるに至った。

なお、本発明における野性型酵素とは、生物由来の酵素の他に、生物由来の酵素に人工的に変異させて得られた酵素を含むものとする。

【0013】

すなわち、本発明は、野性型酵素の活性を保持するとともに、過酸化水素等の酸化に対する抗酸化特性を有する酵素蛋白質、及びその製造方法を提供することを目的とするものである。

【0014】

【課題を解決するための手段】

本発明では、上記目的を達成するために、次のような構成を採る。

1. L-アラニン、L-アスパラギン酸、L-グルタミン酸、L-フェニルアラニン、L-グリシン、L-ヒスチジン、L-イソロイシン、L-リジン、L-ロイシン、L-アスパラギン、L-プロリン、L-グルタミン、L-アルギニン、L-セリン、L-トレオニン、L-バリン、L-チロシン、及びL-トリプトファンの18種類のL-アミノ酸残基から構成される硫黄原子を含まない酵素蛋白質。

2. L-アラニン、L-アスパラギン酸、L-グルタミン酸、L-フェニルアラニン、L-グリシン、L-ヒスチジン、L-イソロイシン、L-リジン、L-ロイシン、L-アスパラギン、L-プロリン、L-グルタミン、L-アルギニン、L-セリン、L-トレオニン、L-バリン、L-チロシン、L-トリプトファン、L-システイン、及びL-メチオニンの20種類のL-アミノ酸残基から構成される酵素蛋白質のL-システイン及びL-メチオニン残基をL-アラニン、L-アスパラギン酸、L-グルタミン酸、L-フェニルアラニン、L-グリシン、L-ヒスチジン、L-イソロイシン、L-リジン、L-ロイシン、L-アスパラギン、L-プロリン、L-グルタミン、L-アルギニン、L-セリン、L-トレオニン、L-バリン、L-チロシン、及びL-トリプトファンの18種類のL-アミノ酸残基に置換した、元の酵素蛋白質の活性を保持し耐酸化性を有する1に記載の硫黄原子を含まない酵素蛋白質。

3. アミノ酸置換が合成DNAを使用した部位特異的変異法により行われたものである2に記載の硫黄原子を含まない酵素蛋白質。

4. 酵素活性が酸化還元活性、もしくは加水分解活性の機能を有することを特徴とする1～3に記載の硫黄原子を含まない酵素蛋白質。

5. ジヒドロ葉酸還元酵素活性を保持し耐酸化性を有することを特徴とする1～4に記載の硫黄原子を含まない酵素蛋白質。

6. キシラナーゼの活性を保持し耐酸化性を有することを特徴とする1～4に記載の硫黄原子を含まない酵素蛋白質。

7. 次の工程からなる組み合わせ変異による硫黄原子を含まない酵素蛋白質の製造方法。

(1) 硫黄原子を含むアミノ酸（含硫アミノ酸）の配列上の位置が A_i ($i = 1 \sim n$) である、 n 個の含硫アミノ酸を含む全長 m 個のアミノ酸よりなる酵素蛋白質をコードするDNA配列のL-メチオニンをコードする開始コドンを、L-メチオニン-L-アラニン、L-メチオニン-L-セリン又はL-メチオニン-L-プロリンのコドンで置換した変異体遺伝子を作成し、これを宿主細胞で発現し得られた変異体酵素蛋白質の酵素活性を測定し、最も活性が高いものを選び得られる置換変異体を A_1/MA_1 とする、

(2) その他の部位の A_i ($i = 2 \sim n$) の含硫アミノ酸をコードするコドンを

請求項 1 に記載の 18 種類の他のアミノ酸をコードするコドンで置換した変異遺伝子を作成し、これを宿主細胞で発現して得られた変異体酵素蛋白質の酵素活性を測定し、酵素活性を示す p 個の変異体酵素蛋白質を選び得られる置換変異体を A_i/B_{ij} ($j=1\sim p$) とする、

(3) 置換変異体のうち活性の高いものから最大 3 個の置換変異体 A_i/B_{i1} 、 A_i/B_{i2} 及び A_i/B_{i3} を選択するが、ここで置換変異体は $A_i/B_{i1} > A_i/B_{i2} > A_i/B_{i3} > \dots > A_i/B_{ip}$ の順に活性が小さくなるものとする、

(4) 全ての部位 A_i ($i=2\sim n$) の含硫アミノ酸について、(2)、(3)と同様にして活性を有する置換変異体を選択し、それらの変異体と A_1/MA_1 の変異体を全て組み合わせた最大 $3 \times (n-1)$ 個の変異体を作成し、それらの酵素活性を測定して元の酵素蛋白質と同等以上の活性を有する変異体酵素蛋白質を作成する。

8. 次の工程からなる段階的変異による硫黄原子を含まない酵素蛋白質の製造方法。

(1) 硫黄原子を含むアミノ酸 (含硫アミノ酸) の配列上の位置が A_i ($i=1\sim n$) である、 n 個の含硫アミノ酸を含む全長 m 個のアミノ酸よりなる酵素蛋白質をコードする DNA 配列の L-メチオニンをコードする開始コドンを、L-メチオニン-L-アラニン、L-メチオニン-L-セリン又は L-メチオニン-L-プロリンのコドンで置換した変異体遺伝子を作成し、これを宿主細胞で発現して得られた変異体酵素蛋白質の酵素活性を測定し、最も活性が高いものを選び得られる置換変異体を A_1/MA_1 とする、

(2) A_1/MA_1 変異体の A_2 の含硫アミノ酸をコードするコドンを請求項 1 に記載の 18 種類の他のアミノ酸をコードするコドンで置換した変異遺伝子を作成し、これを宿主細胞で発現して得られた 2 重変異体酵素蛋白質の酵素活性を測定し、活性の高いものから最大 3 個の 3 重変異体を選ぶ、

(3) 得られた 2 重変異体のそれぞれの A_3 の含硫アミノ酸をコードするコドンを請求項 1 に記載の 18 種類の他のアミノ酸をコードするコドンで置換した変異遺伝子を作成し、これを宿主細胞で発現して得られた 3 重変異体酵素蛋白質の酵

素活性を測定し、活性の高いものから最大 3 個の 3 重変異体を選ぶ、

(4) 以下同様に、4 重、 \dots 、 n 重変異体を作成し、最後の n 重変異体の酵素活性を調べ、元の酵素の活性と同等以上の活性を有する変異体酵素蛋白質を作成する。

9. 段階的に変異する部位の順番が、 A_1 、 A_2 、 \dots 、 A_n の順列組み合わせの種類 ($n!$ 通り) のうちどれか一つであることを特徴とする 8 に記載の段階的変異による硫黄原子を含まない酵素蛋白質の製造方法。

10. 含硫アミノ酸の配列上の位置が A_i ($i = 1 \sim n$) である、 n 個の含硫アミノ酸を含む全長 m 個のアミノ酸よりなる酵素蛋白質において、 k 個の部位に関しては 7 に記載の方法を行い、残りの $n - k$ 個の部位に関しては 9 に記載の方法を行うことを特徴とする硫黄原子を含まない酵素蛋白質の製造方法。

【0015】

本発明において、元の蛋白質の活性を保持するとは、野性型酵素の 10% 以上の活性、好ましくは 50% 以上の活性、特に好ましくは 100% 以上の活性を有し、元の酵素蛋白質と同様の用途に使用できることを意味する。

【0016】

【発明の実施の形態】

次に、本発明において目的とする酵素蛋白質を得るための手順について説明する。

全長 m 個のアミノ酸よりなる野性型酵素において含硫アミノ酸が n 個あるとする。その各々のアミノ酸配列上の位置を、 A_i ($i = 1 \sim n$) とする。

【0017】

蛋白質の開始コドンに由来するアミノ酸は、 L -メチオニンである。

アミノ末端の L -メチオニンを含まないようにするためには、宿主細胞が有するメチオニルアミノペプチダーゼ (methionyl-aminopeptidase) の反応特異性に従い、メチオニンをアミノ末端から脱離させることができる。

【0018】

例えば、宿主として大腸菌を用いた場合、アミノ末端を L -メチオニン- L -アラニン、 L -メチオニン- L -セリン、もしくは L -メチオニン- L -プロリ

ンのいずれかにすることにより、末端のL-メチオニンが脱離した形で発現させることができる。従って、まず第一に、酵素のアミノ末端の変異として、L-メチオニン-L-アラニン、L-メチオニン-L-セリン、もしくはL-メチオニン-L-プロリンのコドンを含む変異体遺伝子を作製し、これを宿主で発現させ、得られた変異体の活性を測定し、最も活性が高いものを選ぶことにより、アミノ末端がメチオニンでない変異酵素を作製できる。

【0019】

この様にして得られる変異を、A1/MA1と表す。

その他の部位のAi (i=2~n)の含硫アミノ酸に関して、含硫アミノ酸をコードするコドンを段落番号0014の1.に記載の含硫アミノ酸以外の他のアミノ酸(最大18種類)をコードするコドンで置換した変異遺伝子を作成し、これを宿主細胞で発現して得られた2重変異体酵素蛋白質の酵素活性を調べる。

【0020】

酵素蛋白質中の特定の部位でのアミノ酸置換は、合成DNAを用いた部位特異的変異法により行うことができる。

部位特異的変異法としては、ZollerとSmithらの方法(Zoller, M.J. and Smith, M. (1983) Methods in Enzymology, vol.100, p.468)及びその改良方法、本実施例で用いているPCRを利用した方法などの他多く方法が公知である。本発明においては、目的の含硫アミノ酸部位でのアミノ酸置換できる変異方法であればどのような方法でも適用可能であり、目的を達成することができる。従って、変異体の作製方法によって本発明は制限を受けない。

【0021】

Aiの含硫アミノ酸の置換変異体を作製し、その活性を調べると、野生型酵素と同等もしくはそれ以上の活性を示す変異体がp個見いだされる。そのアミノ酸を、Bij (j=1、~p)とする。ただし、Ai/Bij置換変異体の活性を高いものから並べるものとする。即ち、Ai/Bi1>Ai/Bi2>Ai/Bi3>...>Ai/Bipの順に変異体の活性が小さくなるものとする。

【0022】

Ai/Bij置換変異のうち、活性の高いものから最大3個の置換変異、即ち

、 A_i/B_{i1} 、 A_i/B_{i2} 、及び A_i/B_{i3} を選ぶ。

全ての i ($i=2\sim n$) について同じように選び、それらの変異と A_1/MA_1 の変異を全て組み合わせた最大 $3 \times (n-1)$ 個の変異体を作製し、 $3 \times (n-1)$ 個の変異体の活性を調べ、野性型酵素の活性と同等もしくは優れたものを選ぶ。

【0023】

このようにして得られる変異酵素は、含硫アミノ酸を含まないことが明らかである。

また、このようにして作製される野性型酵素と同等もしくはそれ以上の活性を示す含硫アミノ酸を含まない酵素は、過酸化水素などの処理により酸化を受けにくいという特徴を有する全く新規な酵素である。

【0024】

上記段落番号0018～0022に記載した含硫アミノ酸を含まない酵素の作製方法を、ここでは「組み合わせ変異による含硫アミノ酸を含まない酵素の作製方法」と呼ぶ。

【0025】

本発明の野性型酵素と同等もしくはそれ以上の活性を示す含硫アミノ酸を含まない酵素は、次に示す方法によっても作製することができる。

上記段落番号0018、0019に記載した方法に従い A_1/MA_1 変異体を作製する。

次に、同様に A_1/MA_1 変異体の A_2 の含硫アミノ酸を含硫アミノ酸以外の他のアミノ酸（最大18種）に置換した2重変異体（最大18種）をそれぞれ作製し、その酵素活性を調べる。

【0026】

2重変異体の活性を調べると、野性型と同等もしくはそれ以上の活性を示す変異体が見いだされる。2重変異のうち活性の高いものから最大3個の2重変異体を選ぶ。

次に、得られた2重変異体のそれぞれの A_3 の含硫アミノ酸を含硫アミノ酸以外の他のアミノ酸（最大18種）に置換した3重変異体をそれぞれ作製し（最大、

3 x 18 = 54 種)、その酵素活性を調べる。

【0027】

3 重変異体の活性を調べると、野性型と同等もしくはそれ以上の活性を示す変異体が見いだされる。

以下同様に、4 重、・・・、n 重変異体を作製する。最後の n 重変異体が、目的の含硫アミノ酸を含まない酵素である。

【0028】

なお、説明の都合で、変異する部位の順番を、A1、A2、・・・、Anとしたが、変異の順番は、順列組み合わせの種類 (n! 通り) のうちどれか一つを適当に選ぶものとする。

【0029】

段落番号 0025～0028 に記載した含硫アミノ酸を含まない酵素の作製方法を、ここでは「段階的変異による含硫アミノ酸を含まない酵素の作製方法」と呼ぶ。

「段階的変異による含硫アミノ酸を含まない酵素の作製方法」においては、最大 $[4(A1) + 18(A2) + 54 \times (n-2)(A3 \sim An)]$ の変異体を調べることになる。

【0030】

また、本発明の野性型酵素と同等もしくはそれ以上の活性を示す含硫アミノ酸を含まない酵素は、「組み合わせ変異による含硫アミノ酸を含まない酵素の作製方法」と「段階的変異による含硫アミノ酸を含まない酵素の作製方法」を部分的に組み合わせた方法（ここでは「組み合わせ変異と段階的変異との組み合わせによる含硫アミノ酸を含まない酵素の作製方法」と呼ぶ）を用いても作製できることは自明であろう。

【0031】

本発明の硫黄原子を含まない酵素蛋白質の作製のためには、対象とする野性型酵素のアミノ酸配列及び塩基配列の情報が有れば十分である。例えば、塩基配列の情報に従い PCR プライマーを合成し、野性型酵素を生産する細胞の DNA もしくは cDNA もしくは組み換えプラスミド DNA を鋳型として、PCR 法により野性型酵素

をコードするDNAを合成することできる。また、塩基配列を元に化学合成によっても野性型酵素をコードするDNAを作製することができる。このようにして得られた野性型酵素をコードするDNAに、本発明に示される方法に従って変異を施すことにより本発明を行うことができる。従って、本発明は野性型酵素の遺伝子によって制限を受けない。

【0032】

本発明の実施例においては、酸化還元酵素の代表例として、大腸菌由来のジヒドロ葉酸還元酵素（DHFRと略す）のシステインフリー変異体（AS-DHFRと略す）を出発物質として、AS-DHFR中に5個含まれるメチオニンを他のアミノ酸に置き換えて、2個のシステイン残基及び5個のメチオニン残基を含む野性型DHFRの酵素活性を遥かに凌ぐ高活性型の含硫アミノ酸を含まないDHFRの作製を示している。また、加水分解酵素の代表例として、枯草菌由来のキシラナーゼに含まれる2個のメチオニンを他のアミノ酸に置き換えて、野性型酵素と同等の活性を示す含硫アミノ酸を含まないキシラナーゼの作製を示している。

【0033】

また、配列表配列番号1に、AS-DHFRのアミノ酸配列を、配列表配列番号2に、制限酵素BamHIで切り出し可能で且つ大腸菌の適当なベクターのBamHI部位に導入することにより大腸菌で高発現可能な遺伝子配列を、配列表配列番号3に枯草菌由来のキシラナーゼのアミノ酸配列を、配列表配列番号4に枯草菌由来のキシラナーゼをコードするDNA配列をそれぞれ示している。

【0034】

配列表配列番号2のDNAは、本発明者らが報告した配列（Journal of Biochemistry vol.117, p.480-488(1995)に記載）を持つ組み換えプラスミドpTZDHFR20を鋳型として、例えば、5'-ggatccttgacaattagttaactat-3'と5'-ggatcccttaacgacgctcgaggattt-3'の2つのプライマーDNAを用いてPCR法を用いて作製できる。また、配列番号2の配列に基づいて化学合成法によっても作製できる。

【0035】

配列表配列番号4のDNAは、枯草菌の染色体DNAから、例えば、5'-gctagcacagactactggcaaaat-3'と5'-ttaccatacggtaacattcgacg-3'に示すプライマーDNAを用

いてPCR法を用いて作製できる。本発明では、枯草菌の染色体DNAとして、シグマ社が販売している染色体DNA（製品番号D4041）を用いて分離したものをを用いている。また、配列番号4の配列に基づいて化学合成法によっても作製できる。

【0036】

AS-DHFRは159個のアミノ酸より構成されるが、このうち1、16、20、42、及び92番目のアミノ酸がメチオニンである。これらのメチオニンを他のアミノ酸に置換した酵素を作製する方法として、実施例においては「組み合わせ変異と段階的変異との組み合わせによる含硫アミノ酸を含まない酵素の作製方法」を用いた方法を示している。

表1～5は、AS-DHFRの1、16、20、42及び92番目のメチオニンを他のアミノ酸に置換した変異体の酵素活性を示す表であり、そして、表6はAS-DHFRの42番目及び92番目のメチオニンを他のアミノ酸で置換した変異体の酵素活性、

表7はAS-DHFRの16番目及び20番目のメチオニンを他のアミノ酸で置換した変異体の酵素活性を示す表である。

【0037】

1番目のメチオニンに関しては、段落番号0018～0019に記載した方法に従い、3種類の変異体を作製したところ、メチオニン→アラニンが最適なものとして選ばれた。（表1参照）この変異体を、AS-DHFR-A1と名付けた。

【0038】

AS-DHFRの16、20、42、及び92番目のメチオニンに関しては、それぞれメチオニンのコドンであるATGをNNY（NはA,T,G,Cの塩基を表し、Yは、T,Cの塩基を表す。）に変えた配列を有するプライマーを用いてランダム塩基置換変異体を作製し、得られた変異体の塩基配列と酵素活性を測定した。その結果、16番目のアミノ酸として好適なものとして、アラニン、フェニルアラニン、アスパラギンが、20番目のアミノ酸として好適なものとして、イソロイシン、ロイシン、バリンが、42番目のアミノ酸として好適なものとして、バリンとチロシンが、92番目のアミノ酸として好適なものとして、フェニルアラニンとイソロイシンがそれぞれ示された。（表2～5参照）

【0039】

次に、42番目のアミノ酸として好適なアミノ酸であるバリンとチロシンと、92番目のアミノ酸として好適アミノ酸であるフェニルアラニンとイソロイシンとを組み合わせることにより、AS-DHFR-A1の42及び92番目のアミノ酸置換変異体を作製し、得られた変異体の塩基配列と酵素活性を測定した結果、42番目がチロシンで92番目がフェニルアラニンの組合わせが最も高い活性を示した（野性型酵素の約3倍）。この変異体を、AS-DHFR-A1-M42Y-M92Fと名付けた。（表6参照）

【0040】

次に、16番目のアミノ酸として好適なアミノ酸であるアラニン、フェニルアラニン、アスパラギンと、20番目のアミノ酸として好適アミノ酸であるイソロイシン、ロイシン、バリンとを組み合わせることにより、AS-DHFR-A1-M42Y-M92Fの16及び20番目のアミノ酸置換変異体を作製し、得られた変異体の塩基配列と酵素活性を測定した。その結果、表7に示す様に、野性型酵素の活性を越える変異体酵素が得られた。その中でも、16番目がアスパラギンで20番目がロイシンの組合わせが最も高い活性を示した（野性型酵素の約12倍）。この変異体を、ANLYFと名付けた（AS-DHFRのM1MA、M16N、M20L、M42Y、M92Fの各メチオニン部位の変異の一文字表記にちなんだ。以下、同様の表記を用いた）。

ANLYF以外にも、野性型酵素より高い活性を示す硫黄原子を含まない変異体として、AFLYF、AFIYF、ANIYF、AFVYF、ANVYFなど計9個の変異体を得られた。

【0041】

この結果は、硫黄原子を含まない酵素蛋白質として多くの可能性が有ることを示している。少なくとも本発明の方法に従って野性型酵素配列を変換していくことにより、野性型酵素より高い活性を示す硫黄原子を含まない酵素に到達できる。このように、本発明の有効性が証明された。

【0042】

キシラナーゼは、185アミノ酸より構成されるが、このうち158及び169番目のアミノ酸がメチオニンである。これらのメチオニンを他のアミノ酸に置換した酵素を作製する方法として、実施例においては「段階的変異による含硫アミノ酸を含まない酵素の作製方法」を用いた方法を示している。

【0043】

具体的には、上記ANLYFのカルボキシ末端とキシラナーゼのアミノ末端をGly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Glyの配列でつないだ融合蛋白質（これをNL-キシラナーゼと名付けた）を作製した。NL-キシラナーゼANLYF部分及びリンカー部分にはメチオニン及びシステインのいずれも含まれない。ANLYFと融合させることによりNL-キシラナーゼ変異体融合遺伝子が導入された形質転換株をトリメトプリム耐性で選択できること及びキシラナーゼの活性とDHFR活性とを測定し、[キシラナーゼの活性]/[DHFR活性]の値を計算することにより、NL-キシラナーゼ変異体の蛋白質量を測定しなくてもキシラナーゼ変異体の活性と野性型キシラナーゼの活性を比較できるという特徴を有する。

【0044】

NL-キシラナーゼのキシラナーゼ部分の158番目のメチオニンのコドンであるatgをnny（nはa,c,g,tの塩基を表し、yは、t,cの塩基を表す。）に変えた配列を有するプライマーを用いてランダム塩基置換変異体を作製し、得られた変異体の塩基配列と酵素活性を測定した結果、ロイシンに置換した変異体が野性型の127%の活性を示した。この変異体を、NL-キシラナーゼ(M158L)と名付けた。

【0045】

次に、NL-キシラナーゼ(M158L)のキシラナーゼ部分の168番目のメチオニンのコドンであるatgをnny（nはa,c,g,tの塩基を表し、yは、t,cの塩基を表す。）に変えた配列を有するプライマーを用いてランダム塩基置換変異体を作製し、得られた変異体の塩基配列と酵素活性を測定した。その結果、イソロイシンに置換した変異体が野性型の151%の活性を示した。この変異体を、NL-キシラナーゼ(M158L,M169I)と名付けた。

【0046】

得られたNL-キシラナーゼ(M158L,M169I)のDHFR部分、リンカー部分、及びキシラナーゼのいずれの部分にも、含硫アミノ酸であるシステイン及びメチオニンを含まない。それにも係わらず、DHFRおよびキシラナーゼのそれぞれの酵素活性は、それぞれ対応する野性型酵素よりも高い活性を示した。

【0047】

DHFRは、ニコチンアミド補酵素を要求する酸化還元反応を触媒するいわゆる酸化還元酵素であり、キシラナーゼは、高分子多糖を加水分解反応を触媒するいわゆる加水分解酵素である。本発明において示す2例の実施例が示すことは、酸化還元反応と加水分解反応という全く異なった反応を触媒する酵素において、含硫アミノ酸を全く含まないようにしてしても、生物進化において生じた野性型酵素を越える活性を有する酵素が作れることである。このことから、野性型酵素に含まれる含硫アミノ酸の全てを他のアミノ酸に置換した蛋白質の中には、野性型酵素の活性を越えるもしくは同等の活性を示すものが存在するものと考えられる。本発明は、そのような含硫アミノ酸を全く含まない酵素に至る確実な方法を提供するものである。従って、本発明が、本明細書に記載の含硫アミノ酸を全く含まない酵素の作製方法によって作製可能な含硫アミノ酸を全く含まない全ての酵素を含むことは、自明である。

【0048】

本発明のジヒドロ葉酸還元酵素は、つぎの反応式1で表される

(反応1)



を触媒する。(上記反応式において、「 \longrightarrow 」は矢印を意味する、以下同様)

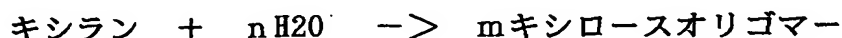
【0049】

ジヒドロ葉酸還元酵素の活性は、反応に伴う基質の減少を、340nmの吸光度の減少で追跡することができる。本発明において、酵素反応液の組成を、50mMリン酸緩衝液(pH7)、0.1mM NADPH、0.05mM ジヒドロ葉酸、12mM 2-メルカプトエタノール、及び適当量の酵素とし、酵素反応液1mlを分光光度計用のキュベットにとり、酵素液を加えることにより反応を開始し、340nmの吸光度の1分間あたりの変化量を測定し、この量を持って活性の指標とした。

【0050】

本発明のキシラナーゼは、次の反応式2で表される

(反応2)



を触媒する。

【0051】

キシラナーゼの活性は、生成するオリゴキシロースの還元末端に由来する還元力の増加をネルソンソモギ法により測定することによって行うことができる。本発明において、酵素反応液の組成を、50mM 酢酸ナトリウム緩衝液(pH6.0)、2 mg/ml オート麦由来のキシラン、及び適当量の酵素とし、酵素反応液0.25mlを試験管にとり、酵素液を加えることにより反応を開始し、10分間反応を行い、0.25mlの銅-アルカリ試薬を加えた後、沸騰水中で10分間保持し、その後室温に冷却した後砒素-モリブデン酸試薬0.25mlを加え、着色させる。着色の強さを500nmの吸光度により測定し、対照試料の吸光度との差を求め、酵素活性の指標とした。

【0052】

酵素活性の測定方法としては、種々の方法が開発され利用されていることは公知の事実であり、目的とする酵素の活性測定法によって本発明が制限を受けないことは明白である。

【0053】

本発明によって製造された、硫黄原子を含まないジヒドロ葉酸還元酵素及びジヒドロ葉酸還元酵素-キシラナーゼ融合蛋白質は、過酸化水素により容易に酸化されるシステイン及びメチオニンを配列に含まないため、0.1Mの高濃度の過酸化水素水を用いて処理しても酸化されることは無く、酸化に対する抵抗性が著しく増大した。ジヒドロ葉酸還元酵素及びジヒドロ葉酸還元酵素-キシラナーゼ融合蛋白質いずれにおいても、硫黄原子を含む酵素の場合、0.1Mの過酸化水素水で処理することにより、全ての硫黄分子が酸化され、このことにより酵素活性が約10分の1以下に低下する。このように抗酸化性を高めることにより酵素の形質の安定性に寄与できることが実証されている。

【0054】

【実施例】

以下に、実施例により本発明を説明するが、これらの具体例は本発明を限定するものではない。

なお、本実施例における、PCR法によるDNAの増幅反応、制限酵素によるDNAの

切断反応、T4-DNAリガーゼ、大腸菌への形質転換によるDNAの結合反応は、市販のPCRキット、制限酵素、T4-DNAリガーゼ、及び大腸菌コンピテントセルに添付している標準プロトコールに従って行った。

【0055】

(実施例1) 硫黄原子を含まないジヒドロ葉酸還元酵素の作製

硫黄原子を含むジヒドロ葉酸還元酵素として本実施例においては、AS-DHFRを用いている。AS-DHFRの酵素活性安定性などの性質は、野性型酵素とほぼ一致している。(M. Iwakura, B.E. Jones, J. Luo, & C.R. Matthews, J. Biochemistry, 117, 480-488 (1995) に記載)

【0056】

AS-DHFRのアミノ酸配列及びその遺伝子の塩基配列をそれぞれ配列表配列番号1及び配列表配列番号2に示す。

AS-DHFRの遺伝子は「pTZDHFR20」と名付けられたプラスミドに組み込まれている(M. Iwakura, B.E. Jones, J. Luo, & C.R. Matthews, J. Biochemistry, 117, 480-488 (1995) に記載)。

【0057】

2本の化学合成プライマーDNA、5'-ggggatcctcttgacaattagttaactatttgttataatgtattc-3'及び5'-ggggatcccttatgcacagccaccgccaccacgacgctcgaggatttcg-3'を用いることにより、pTZDHFR20を鋳型として、PCR法により増幅することにより、制限酵素BamHIで切り出すことができ、且つAS-DHFRを発現できる遺伝子配列を作製した(これを、DNA1とする)。

【0058】

PCR法により増幅したDNA配列を鋳型として、1番目のアミノ酸であるメチオニンをL-メチオニン-L-アラニン、L-メチオニン-L-セリン、もしくはL-メチオニン-L-プロリンに変異する遺伝子の作製を行った。そのため、2本の化学合成プライマーDNA、5'-ggggatcctcttgacaattagttaactatttgttataatgtattc-3'及び5'-cgcaatcagactgatngncatggaagttcctccttttccggatt-3'(ただし、nはa,c,g,tの塩基を表わす。))を用いてPCR法により増幅したDNA(これをDNA2とする。))と2本の化学合成プライマーDNA、5'-ggaggaacttccatgncnatcagtctga

ttgcggcgctagcggtagat-3' (ただし、nはa,c,g,tの塩基を表わす。) 及び 5'-ggg
gatcccttatgcacagccaccgccaccacgacgctcgaggatttcg-3' を用いてPCR法により増幅
したDNA (これをDNA3とする。) を作製し、次に、DNA2とDNA3を同量混合した
のち、2本の化学合成プライマーDNA、5'-ggggatcctcttgacaattagttactatttgtt
ataatgtattc -3' 及び 5'-ggggatcccttatgcacagccaccgccaccacgacgctcgaggatttcg
-3' を用いてPCR法により増幅して得られたDNA (これをDNA4とする。) を作製し
た。

【0059】

DNA4をBamHIで切断した後、市販のプラスミドベクターpUC19をBamHIで切断し
たものとを合わせ、両者をT4-DNAリガーゼで結合し、組み換えプラスミドを作製
した。得られた組み換えプラスミドを用いて大腸菌JM109株を形質転換し、寒天
培地1 (1 lあたり5 gの食塩、5gの酵母エキス、8 gのトリプトン、100 mgのア
ンピシリンナトリウム、50mgトリメトプリム、及び15 gの寒天を含んでいる) で
生育する変異株を選択した。寒天培地1で形成したコロニー15個について、プ
ラスミドを分離し、その塩基配列を決定することにより、1番目のアミノ酸であ
るメチオニンをL-メチオニン-L-アラニン、L-メチオニン-L-セリン、
もしくはL-メチオニン-L-プロリンに変異した遺伝子が組み込まれた形質転
換株を分離した。分離した形質転換株それぞれを培地1 (1 lあたり5 gの食塩
、5gの酵母エキス、8 gのトリプトン、及び100 mgのアンピシリンナトリウムを
含んでいる) で37度で一晩培養し、660nmの吸光度が1に合わせ、その培養液1
mlから菌体を収集し、0.2mlの10mMリン酸緩衝液(pH7.0) に懸濁し、音波破碎
後、遠心分離によって得られた上清についてそのDHFR酵素活性を調べた。その
結果を表1に示す。

以下の表において、DHFR活性は野生型酵素の活性を100%として、%で表示し
たものである。

【0060】

(表1)

[変異の種類]	[DHFR活性]
L-メチオニン-L-アラニン	103

(AS-DHFR-A1)

L-メチオニン-L-セリン 98

L-メチオニン-L-プロリン 89

【0061】

この結果、1番目のアミノ酸の変異としてL-メチオニン-L-アラニンが適していることが示された（この変異体をAS-DHFR-A1と称する。また、AS-DHFR-A1の遺伝子を組み込んだ組み換えプラスミドを、pAS-DHFR-A1と称する）。また、AS-DHFR-A1を高度に精製して、アミノ末端の配列を調べたところ、99%以上がアラニンであり、遺伝子配列上の開始コドンに由来するメチオニンは、大腸菌を用いて発現する際に、メチオニルアミノペプチダーゼ(methionyl-aminopeptidase)によりほぼ完全に切除されたことが示された。

【0062】

AS-DHFRの16、20、42、及び92番目のメチオニンに関しては、それぞれメチオニンのコドンであるatgをnny（nはa,c,g,tの塩基を表し、rはa,gの塩基を、yはc,tの塩基を表す。）に変えた配列を有するプライマーを用いてランダム塩基置換変異体を作製し、得られた変異体の塩基配列と酵素活性を測定した。

【0063】

16番目のメチオニンの変異体の作製には、DNA1を鋳型として、2本の化学合成プライマーDNA、5'-ggggatcctcttgacaattagttactatttgttataatgtattc-3'と5'-ggcatggcggtttcrnngccgataacgcgatctaccgcta-3'を用いてPCR法により増幅したDNA（これをDNA5とする。）と2本の化学合成プライマーDNA、5'-gatcgcgttatcggnnygaaaacgccatgccatggaac-3'及び5'-ggggatcccttatgcacagccaccgccaccacgacgctcgaggatttcg-3'を用いてPCR法により増幅したDNA（これをDNA6とする。）を作製し、次に、DNA5とDNA6を同量混合したのち、2本の化学合成プライマーDNA、5'-ggggatcctcttgacaattagttactatttgttataatgtattc-3'及び5'-gggga tcccttatgcacagccaccgccaccacgacgctcgaggatttcg-3'を用いてPCR法により増幅して得られたDNA（これをDNA7とする。）を作製した。DNA7をBamHIで切断した後、段落番号0059と同様にして寒天培地1に生育するコロニーを調べ、その結果を表2に示した。

【0064】

(表 2)

〔変異の種類〕	〔DHFR活性〕
(16番目のアミノ酸)	
L-アラニン	99
L-アスパラギン酸	9.5
L-フェニルアラニン	234
グリシン	31
L-ヒスチジン	44
L-イソロイシン	52
L-ロイシン	30
L-アスパラギン	100
L-プロリン	1.7
L-アルギニン	60
L-セリン	95
L-トレオニン	61
L-バリン	34
L-チロシン	73

【0065】

この結果から、16番目のアミノ酸として好適なものとして、アラニン、フェニルアラニン、アスパラギンが、示された。

【0066】

20番目のメチオニンの変異体の作製には、DNA1を鋳型として、2本の化学合成プライマーDNA、5'-ggggatcctcttgacaattagtttaactatttgttataatgtattc-3'と5'-aggcaggttccatggrnnggcgttttccatgccgataac-3'を用いてPCR法により増幅したDNA(これをDNA8とする。)と2本の化学合成プライマーDNA、5'-ggcatggaaaacgccnnyccatggaacctgcctgccgatac-3'及び5'-ggggatcccttatgcacagccaccgccaccaacgacgctcgaggatttcg-3'を用いてPCR法により増幅したDNA(これをDNA9とする。)を作製し、次に、DNA8とDNA9を同量混合したのち、2本の化学合成プライマ

—DNA、5'-ggggatcctcttgacaattagttactatttgttataatgtattc-3' 及び 5'-gggga
tcccttatgcacagccaccgccaccacgacgctcgaggatttcg-3' を用いてPCR法により増幅し
て得られたDNA（これをDNA10とする。）を作製した。DNA10をBamHIで切断した後
、段落番号0059と同様にして寒天培地1に生育するコロニーを調べ、その結
果を表3に示した。

【0067】

（表3）

〔変異の種類〕	〔DHFR活性〕
(20番目のアミノ酸)	
L-アスパラギン酸	3.7
グリシン	0.8
L-ヒスチジン	1.7
L-イソロイシン	182
L-ロイシン	283
L-プロリン	1.2
L-アルギニン	2
L-セリン	20
L-トレオニン	63
L-バリン	122
L-チロシン	46

【0068】

この結果から、20番目のアミノ酸として好適なものとして、イソロイシン、ロ
イシン、バリンが示された。

【0069】

42番目のメチオニンの変異体の作製には、DNA1を鋳型として、2本の化学合
成プライマーDNA、5'-ggggatcctcttgacaattagttactatttgttataatgtattc-3' と5
'-ccagggtatggcgcccrnaatcacgggtttatttaaggtg-3' を用いてPCR法により増幅した
DNA（これをDNA11とする。）と2本の化学合成プライマーDNA、5'-aataaaccc
gtgattnnnyggcgccatacctgggaatcaa-3' 及び 5'-ggggatcccttatgcacagccaccgccacc

acgacgctcgaggatttcg-3' を用いてPCR法により増幅したDNA（これをDNA12とする。）を作製し、次に、DNA11とDNA12を同量混合したのち、2本の化学合成プライマーDNA、5'-ggggatcctcttgacaattagtttaactatttggttataatgtattc-3' 及び 5'-gggatcccttatgcacagccaccgccaccacgacgctcgaggatttcg-3' を用いてPCR法により増幅して得られたDNA（これをDNA13とする。）を作製した。DNA13をBamHIで切断した後、段落番号0059と同様にして寒天培地1に生育するコロニーを調べ、その結果を表4に示した。

【0070】

(表4)

〔変異の種類〕 〔DHFR活性〕

(42番目のアミノ酸)

L-アラニン	63
L-フェニルアラニン	49
グリシン	5.5
L-トレオニン	14
L-バリン	71
L-チロシン	167

【0071】

この結果から、42番目のアミノ酸として好適なものとして、バリンとチロシンが示された。

【0072】

92番目のメチオニンの変異体の作製には、DNA1を鋳型として、2本の化学合成プライマーDNA、5'-ggggatcctcttgacaattagtttaactatttggttataatgtattc-3' と 5'-tccgccgccaatcacrnngatttctggtacgtcacctgcg-3' を用いてPCR法により増幅したDNA（これをDNA14とする。）と2本の化学合成プライマーDNA、5'-gacgtaccagaaatcnnygtgattggcggcggacgcgttt-3' 及び 5'-ggggatcccttatgcacagccaccgccaccacgacgctcgaggatttcg-3' を用いてPCR法により増幅したDNA（これをDNA15とする。）を作製し、次に、DNA14とDNA15を同量混合したのち、2本の化学合成プライマーDNA、5'-ggggatcctcttgacaattagtttaactatttggttataatgtattc-3' 及び 5'-g

gggatcccttatgcacagccaccgccaccacgacgctcgaggatttcg-3' を用いてPCR法により増幅して得られたDNA（これをDNA16とする。）を作製した。DNA16をBamHIで切断した後、段落番号0059と同様にして寒天培地1に生育するコロニーを調べ、その結果を表5に示した。

【0073】

(表5)

〔変異の種類〕 〔DHFR活性〕

(92番目のアミノ酸)

L-アスパラギン酸 34

L-フェニルアラニン 69

グリシン 0.2

L-イソロイシン 37

L-アルギニン 0.5

【0074】

この結果から、92番目のアミノ酸として好適なものとして、フェニルアラニンとイソロイシンが示された。

【0075】

次に、AS-DHFR-A1の42番目のアミノ酸として好適なアミノ酸であるバリンとチロシンと、92番目のアミノ酸として好適アミノ酸であるフェニルアラニンとイソロイシンとを組み合わせることにより、AS-DHFR-A1の42及び92番目のアミノ酸置換変異体を作製し、得られた変異体の塩基配列と酵素活性を測定した。

【0076】

pAS-DHFR-A1を鋳型として、2本の化学合成プライマーDNA、5'-ggggatcctcttgacaattagtttaactatttgttataatgtattc-3'と5'-ccaggtatggcgcccrwmaatcacgggtttatttaaggtg-3' (rはaとgの塩基を、wはaとtの塩基を、mはaとcの塩基を表す、以下同様)を用いてPCR法により増幅したDNA（これをDNA17とする。）と2本の化学合成プライマーDNA、5'-aataaaccgctgattkwyggcgccatacctgggaatcaa-3' (kはgとtの塩基を、wはaとtの塩基を、yはcとtの塩基を表す、以下同様)及び5'-gggatcccttatgcacagccaccgccaccacgacgctcgaggatttcg-3'を用いてPCR法により増

幅したDNA（これをDNA18とする。）を作製し、次に、DNA17とDNA18を同量混合したのち、2本の化学合成プライマーDNA、5'-ggggatcctcttgacaattagttactattttgttataatgtattc -3' 及び 5'-ggggatcccttatgcacagccaccgccaccacgacgctcgaggatttcg-3' を用いてPCR法により増幅して得られたDNA（これをDNA19とする。）を作製した。

得られたDNA19を鋳型として、2本の化学合成プライマーDNA、5'-ggggatcctcttgacaattagttactattttgttataatgtattc -3' と 5'-tccgccgccaatcacrawgatttctgtacgtcacctgcg-3' を用いてPCR法により増幅したDNA（これをDNA20とする。）と2本の化学合成プライマーDNA、5'-gacgtaccagaaatcwtgtgattggcggcgacgcgttt-3' 及び 5'-ggggatcccttatgcacagccaccgccaccacgacgctcgaggatttcg-3' を用いてPCR法により増幅したDNA（これをDNA21とする。）を作製し、次に、DNA20とDNA21を同量混合したのち、2本の化学合成プライマーDNA、5'-ggggatcctcttgacaattagttactattttgttataatgtattc -3' 及び 5'-ggggatcccttatgcacagccaccgccaccacgacgctcgaggatttcg-3' を用いてPCR法により増幅して得られたDNA（これをDNA22とする。）を作製した。

DNA22をBamHIで切断した後、段落番号0059と同様にして寒天培地1に生育するコロニーを調べ、その結果を表6に示した。

【0077】

(表6)

[変異の種類]		[DHFR活性]
(42番目のアミノ酸)		(92番目のアミノ酸)
L-チロシン	L-フェニルアラニン	320
L-チロシン	L-イソロイシン	61.3
L-バリン	L-フェニルアラニン	102
L-バリン	L-イソロイシン	58.9

【0078】

この結果、42番目がチロシンで92番目がフェニルアラニンの組み合わせが最も高い活性を示した（野性型酵素の約3倍以上）。この変異体を、AS-DHFR-A1-M42Y-M92Fと称する。また、AS-DHFR-A1-M42Y-M92Fの遺伝子を組み込んだ組み換えブ

ラスミドを、pAS-DHFR-A1-M42Y-M92Fと名付けた。

【0079】

AS-DHFR-A1-M42Y-M92Fの16番目のアミノ酸として好適なアミノ酸であるアラニン、フェニルアラニン、アスパラギンと、20番目のアミノ酸として好適アミノ酸であるイソロイシン、ロイシン、バリンとを組み合わせることにより、AS-DHFR-A1-M42Y-M92Fの16及び20番目のアミノ酸置換変異体を作製し、得られた変異体の塩基配列と酵素活性を測定した。

【0080】

pAS-DHFR-A1-M42Y-M92Fを鋳型として、3本の化学合成プライマーDNA、5'-ggggatcctcttgacaattagttactatttgttataatgtattc-3'と5'-aggcaggttccacggrkwggcgttttcrytgccgataacgcgatctaccg-3'と5'-aggcaggttccacggrkwggcgttttctgcgccga taacgcgatctaccg-3'を用いてPCR法により増幅したDNA（これをDNA23とする。）と3本の化学合成プライマーDNA、5'-gatcgcggttatcggcarygaaaacgccwmyccgtggaacctgcctgccga-3'と5'-gatcgcggttatcggcgcagaaaacgccwmyccgtggaacctgcctgccga-3'と5'-ggggatcccttatgcacagccaccgccaccacgacgctcgaggatttcg-3'を用いてPCR法により増幅したDNA（これをDNA24とする。）を作製し、次に、DNA23とDNA24を同量混合したのち、2本の化学合成プライマーDNA、5'-ggggatcctcttgacaattagttactatttgttataatgtattc-3'及び5'-ggggatcccttatgcacagccaccgccaccacgacgctcgaggatttcg-3'を用いてPCR法により増幅して得られたDNA（これをDNA25とする。）を作製した。

DNA25をBamHIで切断した後、段落番号0059と同様にして寒天培地1に生育するコロニーを調べ、その結果を表7に示した。

【0081】

(表7)

[変異の種類]	[DHFR活性]
(16番目のアミノ酸)	(20番目のアミノ酸)
L-アラニン	L-イソロイシン 240
L-アラニン	L-ロイシン 579
L-アラニン	L-バリン 102

L-フェニルアラニン L-イソロイシン 176

L-フェニルアラニン L-ロイシン 745

L-フェニルアラニン L-バリン 163

L-アスパラギン L-イソロイシン 102

L-アスパラギン L-ロイシン 989

L-アスパラギン L-バリン 127

【0082】

この結果、16番目がアスパラギンで20番目がロイシンの組み合わせが最も高い活性を示した（野性型酵素の約10倍）。この変異体を、ANLYFと称する。また、ANLYFの遺伝子を組み込んだ組み換えプラスミドを、pANLYFと名付けた。その他の8個の変異体も野性型酵素を越える活性を示した。この結果は、硫黄原子を含まない酵素蛋白質として多くの可能性が有ることを示している。

【0083】

配列表配列番号5に、ANLYFのアミノ酸配列を、配列表配列番号6に、制限酵素BamHIで切り出し可能で且つ適当なベクターのBamHI部位に導入することにより大腸菌で高発現可能なANLYF遺伝子配列をそれぞれ示している。

【0084】

pANLYFを含む大腸菌を、3リッターの培地（15gの食塩、15gの酵母エキス、24gのトリプトン、30mgのアンピシリンナトリウムを含んでいる）で、37度で一晩培養し、湿重量約10gの菌体を得た。この菌体の無細胞抽出液に、ストレプトマイシン硫酸処理、硫酸分画、メソトレキセートアフィニティクロマトグラフィー及びDEAEトヨパールクロマトグラフィーの精製操作を施すことにより、均一にまで蛋白質を精製し、約100mgの均一なANLYFが得られた。アミノ末端分析を行ったところ、ANLYFのアミノ末端の配列は、L-アラニン-L-イソロイシン-L-セリン-L-ロイシン-L-イソロイシンであり、開始コドンに由来するL-メチオニンが取り除かれた配列をしていた。精製して得られた1mgのANLYFを0.1Mの過酸化水素水含む10mMリン酸緩衝液（pH7.0）で室温で一晩放置し、その分子量を調べたところ、処理していないANLYFの分子量と全く同じ値、17,905（計算値17,903）を示した。また、酵素活性も全く変化しなかった。一方、同様の処理をA

S-DHFRにしたところ、過酸化水素水処理前の分子量が17,954(計算値17,950)、過酸化水素水処理後の分子量が18,034であり、全てのメチオニンがメチオニンサルホオキシサイドに酸化されたことが示された。また、全てのメチオニンが酸化されることによりAS-DHFRの酵素活性が約5分の1に低下した。このように、硫黄原子を含まなくすることにより、抗酸化性が付与されたことが示された。

【0085】

(実施例2) 硫黄原子を含まないジヒドロ葉酸還元酵素-キシラナーゼ融合酵素の作製

ジヒドロ葉酸還元酵素とキシラナーゼの融合遺伝子の作製のために、ジヒドロ葉酸還元酵素の遺伝子部分として配列表配列番号6の配列の1から560番目の配列を用い、キシラナーゼ遺伝子部分として、枯草菌の染色体DNAとして、シグマ社が販売している染色体DNA(製品番号D4041)を鋳型として、2本の化学合成プライマーDNA、5'-gctagcacag actactggcaaaat-3'と5'-ttaccatacggtaacattcgacg-3'を用いてPCR法により増幅して得られたDNA(これをDNA26とする。)を作製し、これをGly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Glyのコドンに対応する塩基配列で結合した融合遺伝子を作製した。

【0086】

まず、pNALYFを鋳型とし、2本の化学合成プライマーDNA、5'-ggggatcctcttgacaattagttactatttgttataatgtattc-3'及び5'-gccgccaccacccgagccaccgccaccacgacgctcgaggatttcgaacgaata-3'を用いてPCR法により増幅して得られたDNA(これをDNA27とする。)を作製した。次に、DNA26を鋳型とし、2本の化学合成プライマーDNA、5'-ggtggcgggtggctcgggtggtggcggcgctagcacagactactggcaaaattggactgat-3'及び5'-ggggatccttaccatacggtaacattcgacgagccactactttga-3'を用いてPCR法により増幅して得られたDNA(これをDNA28とする。)を作製した。DNA27とDNA28を同量混合したのち、2本の化学合成プライマーDNA、5'-ggggatcctcttgacaattagttactatttgttataatgtattc-3'及び5'-ggggatccttaccatacggtaacattcgacgagccactactttga-3'を用いてPCR法により増幅して得られたDNA(これをDNA29とする。)を作製した。

DNA29をBamHIで切断した後、段落番号0059と同様にして寒天培地1に生育

するコロニーを10個取り、組み換えプラスミドを分離し、プラスミドに組み込んだ部分の塩基配列を調べ、目的の配列が組み込まれた組み換えプラスミドを分離し、これをpNLXYL-wtと名付けた。

【0087】

配列表配列番号7に、ジヒドロ葉酸還元酵素－キシラナーゼ融合酵素のアミノ酸配列を、配列表配列番号8に、制限酵素BamHIで切り出し可能で且つ適当なベクターのBamHI部位に導入することにより大腸菌で高発現可能なジヒドロ葉酸還元酵素－キシラナーゼ融合酵素遺伝子配列をそれぞれ示している。配列表配列番号7の配列中1から159番目の配列がジヒドロ葉酸還元酵素（ANLYF変異体）の部分で、160から168番目の配列がジヒドロ葉酸還元酵素とキシラナーゼを無理なくつなぐためのリンカー配列であり、169から353番目の配列が野性型キシラナーゼの配列である。

【0088】

キシラナーゼは、185アミノ酸より構成されるが、このうち158及び169番目のアミノ酸がメチオニンである。従って、ジヒドロ葉酸還元酵素－キシラナーゼ融合酵素においては、326番目と337番目の配列がメチオニンである。このジヒドロ葉酸還元酵素－キシラナーゼ融合酵素においてこれ以外に含硫アミノ酸は存在しない。

【0089】

ジヒドロ葉酸還元酵素－キシラナーゼ融合酵素の326番目のメチオニンの変異体の作製には、pNLXYL-wtを鋳型として、2本の化学合成プライマーDNA、5'-ggggatcctcttgacaattagtttaactatttgttataatgtattc-3' と5'-gacttggttaagcccaattactgcccagattgntccatggctcttccatgcgtt-3' を用いてPCR法により増幅したDNA（これをDNA30とする。）を作製した。DNA30を鋳型として、2本の化学合成プライマーDNA、5'-ggggatcctcttgacaattagtttaactatttgttataatgtattc-3' と5'-actttgatactcttctgtgcgcatgacttggttaagcccaattactgcccagatt-3' を用いてPCR法により増幅したDNA（これをDNA31とする）を作製した。更に、DNA31を鋳型として、2本の化学合成プライマーDNA、5'-ggggatcctcttgacaattagtttaactatttgttataatgtattc-3' と5'-ggggggatccttaccatacggtaacattcgacgagccactactttgatatccttctgtcgc-

3'を用いてPCR法により増幅したDNA（これをDNA32とする）を作製した。DNA32をBamHIで切断した後、段落番号0059と同様にして寒天培地1に生育するコロニーを調べた。また、各変異体のキシラナーゼ活性も同時に調べた。

測定したキシラナーゼとジヒドロ葉酸還元酵素の活性から、[キシラナーゼの活性]/[DHFR活性]の値を計算し、pNLXYL-wtを保有する菌体が見出す[キシラナーゼの活性]/[DHFR活性]の値（これを野生型酵素の活性とする）と比較した。その結果を表8に示す。以下の表において、[キシラナーゼの活性]/[DHFR活性]は野生型酵素の活性を100%として、%で表示したものである。

【0090】

(表8)

[変異の種類]		[キシラナーゼの活性] / [DHFR活性]	
(326番目のアミノ酸)			
L-アスパラギン酸		0.0	
L-フェニルアラニン		112	
L-ヒスチジン	5.9		
L-イソロイシン		66	
L-ロイシン	127		
L-アスパラギン		100	L-セリン
	7.9		
L-トレオニン	0.7		
L-バリン	58		

【0091】

この結果から、326番目のアミノ酸として好適なものとして、ロイシンが見された。

この変異体を、NL-キシラナーゼ(M158L)と名付けた。また、NL-キシラナーゼ(M158L)の遺伝子を組み込んだ組み換えプラスミドを、pNLXYL-M158Lと名付けた。

【0092】

NL-キシラナーゼ(M158L)の337番目のメチオニンの変異体の作製には、pNLXYL-M158Lを鋳型として、2本の化学合成プライマーDNA、5'-ggggatcctcttgacaattag

ttaactatttgttataatgtattc-3' と 5'-actttgatataccttctgtcgcgngacttggttaagcccaa
ttactgcccagatt-3' を用いてPCR法により増幅したDNA (これをDNA33とする。
) を作製した。DNA33を鋳型として、2本の化学合成プライマーDNA、5'-ggggatc
ctcttgacaattagtttaactatttgttataatgtattc-3' と 5'-gggggatccttaccatacggttaaca
ttcgacgagccactactttgatataccttctgtcgc-3' を用いてPCR法により増幅したDNA
(これをDNA34とする。) を作製した。DNA34をBamHIで切断した後、段落番号0
059と同様にして寒天培地1に生育するコロニーを調べた。また、各変異体の
キシラナーゼ活性も同時に調べた。その結果を表9に示す。

【0093】

(表9)

[変異の種類] [キシラナーゼの活性] / [DHFR活性]

(337番目のアミノ酸)

L-アスパラギン酸	0.1
グリシン	0.0
L-ヒスチジン	111
L-イソロイシン	151
L-アスパラギン	26
L-プロリン	1.7
L-アルギニン	0.0
L-トレオニン	0.7
L-チロシン	2.1

【0094】

この結果から、326番目のアミノ酸として好適なものとして、イソロイシンが
示された。

この変異体を、NL-キシラナーゼ(M158L,M169I)と名付けた。また、NL-キシラ
ナーゼ(M158L,M169I)の遺伝子を組み込んだ組み換えプラスミドを、pNLXYL-LIと
名付けた。

【0095】

配列表配列番号9に、NL-キシラナーゼ(M158L,M169I)を、配列表配列番号10に

、制限酵素BamHIで切り出し可能で且つ適当なベクターのBamHI部位に導入することにより大腸菌で高発現可能なNL-キシラナーゼ(M158L,M169I)をそれぞれ示している。

【0096】

pNLXYL-LIを含む大腸菌を、3リッターの培地(15gの食塩、15gの酵母エキス、24gのトリプトン、30mgのアンピシリンナトリウムを含んでいる)で、37度で一晩培養し、湿重量約10gの菌体を得た。この菌体の無細胞抽出液に、ストレプトマイシン硫酸処理、硫酸分画、メソトレキセートアフィニティークロマトグラフィー及びDEAEトヨパールクロマトグラフィーの精製操作を施すことにより、均一にまで蛋白質を精製し、約30mgの均一なNL-キシラナーゼ(M158L,M169I)が得られた。アミノ末端分析を行ったところ、NL-キシラナーゼ(M158L,M169I)のアミノ末端の配列は、L-アラニン-L-イソロイシン-L-セリン-L-ロイシン-L-イソロイシン-であり、開始コドンに由来するL-メチオニンが取り除かれた配列をしていた。精製して得られた1mgのNL-キシラナーゼ(M158L,M169I)を0.1Mの過酸化水素水含む10mMリン酸緩衝液(pH7.0)で室温で一晩放置し、その分子量を調べたところ、処理していないNL-キシラナーゼ(M158L,M169I)の分子量と全く同じ値、38,775(計算値38,773)、を示した。また、酵素活性も全く変化しなかった。一方、同様の処理を変異処理する前のジヒドロ葉酸還元酵素-キシラナーゼ融合酵素に対して行ったところ、過酸化水素水処理前の分子量が38,813(計算値38,809)、過酸化水素水処理後の分子量が38,845であり、全てのメチオニンがメチオニンスルホオキサイドに酸化されたことが示された。また、全てのメチオニンが酸化されることによりキシラナーゼの酵素活性が約3分の1に低下した。このように、硫黄原子を含まなくすることにより、抗酸化性が付与されたことが示された。

【0097】

【発明の効果】

本発明によれば、野生型酵素の活性を保持するとともに、過酸化水素等による酸化に対して耐性を有し、化学的に安定な酵素蛋白質、及びその製造方法が提供される。本発明の酵素蛋白質は、性状が安定していることから、バイオセンサー

、バイオリアクター等の用途に幅広く使用することが可能なものであり、実用的価値の高いものである。

【0098】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Director-General of Agency of Industrial Science and Technology

<120> Sulphur Free Enzyme

<130>

<160> 10

<210> 1

<211> 159

<212> PRT

<213> E. coli

<400> 1

Met Ile Ser Leu Ile Ala Ala Leu Ala Val Asp Arg Val Ile Gly

1 5 10 15

Met Glu Asn Ala Met Pro Trp Asn Leu Pro Ala Asp Leu Ala Trp

20 25 30

Phe Lys Arg Asn Thr Leu Asn Lys Pro Val Ile Met Gly Arg His

35 40 45

Thr Trp Glu Ser Ile Gly Arg Pro Leu Pro Gly Arg Lys Asn Ile

50 55 60

Ile Leu Ser Ser Gln Pro Gly Thr Asp Asp Arg Val Thr Trp Val

65 70 75

Lys Ser Val Asp Glu Ala Ile Ala Ala Ala Gly Asp Val Pro Glu

80	85	90
Ile Met Val Ile Gly Gly Gly Arg Val Tyr Glu Gln Phe Leu Pro		
95	100	105
Lys Ala Gln Lys Leu Tyr Leu Thr His Ile Asp Ala Glu Val Glu		
110	115	120
Gly Asp Thr His Phe Pro Asp Tyr Glu Pro Asp Asp Trp Glu Ser		
125	130	135
Val Phe Ser Glu Phe His Asp Ala Asp Ala Gln Asn Ser His Ser		
140	145	150
Tyr Ser Phe Glu Ile Leu Glu Arg Arg		
155		

<210> 2

<211> 566

<212> DNA

<213> E. coli

<221> CDS

<222> (81)...(557)

<400> 2

ggatccttga caattagtta actatttgtt ataatgtatt catgagctta actaactaat
 ccggaaaagg aggaacttcc atgatcagtc tgattgcggc gctagcggta gatcgcgta
 tcggcatgga aaacgccatg ccatggaacc tgcctgccga tctcgctgg tttaaacgca
 acaccttaaa taaaccctg attatggggc gccatactg ggaatcaatc ggtaggcctt
 tgcccggccg caaaaatatt atcctcagca gtcaaccgg gaccgatgat cgggttacct
 gggttaaatc ggtcgacgaa gccatcgcg cgcaggtga cgtaccagaa atcatggtga
 ttggcggcgg acgcgtttat gaacagtict tgccaaaagc gcaaaagctt tatctgacgc
 atatcgatgc agaagtggaa ggcgacaccc attttccgga ttacgagccg gatgactggg
 aatcggtatt cagcgaattc cacgatgctg atgcgcagaa ctgcgatagc tattcgttcg
 aaatcctcga gcgtcggttaa ggatcc

<210> 3

<211> 185

<212> PRT

<213> B. subtilis

<400> 3

Ala Ser Thr Asp Tyr Trp Gln Asn Trp Thr Asp Gly Gly Gly Ile

1 5 10 15

Val Asn Ala Val Asn Gly Ser Gly Gly Asn Tyr Ser Val Asn Trp

20 25 30

Ser Asn Thr Gly Asn Phe Val Val Gly Lys Gly Trp Thr Thr Gly

35 40 45

Ser Pro Phe Arg Thr Ile Asn Tyr Asn Ala Gly Val Trp Ala Pro

50 55 60

Asn Gly Asn Gly Tyr Leu Thr Leu Tyr Gly Trp Thr Arg Ser Pro

65 70 75

Leu Ile Glu Tyr Tyr Val Val Asp Ser Trp Gly Thr Tyr Arg Pro

80 85 90

Thr Gly Thr Tyr Lys Gly Thr Val Lys Ser Asp Gly Gly Thr Tyr

95 100 105

Asp Ile Tyr Thr Thr Thr Arg Tyr Asn Ala Pro Ser Ile Asp Gly

110 115 120

Asp Arg Thr Thr Phe Thr Gln Tyr Trp Ser Val Arg Gln Ser Lys

125 130 135

Arg Pro Thr Gly Ser Asn Ala Thr Ile Thr Phe Ser Asn His Val

140 145 150

Asn Ala Trp Lys Ser His Gly Met Asn Leu Gly Ser Asn Trp Ala

155 160 165

Tyr Gln Val Met Ala Thr Glu Gly Tyr Gln Ser Ser Gly Ser Ser

170 175 180
Asn Val Thr Val Trp
185

<210> 4

<211> 558

<212> DNA

<213> B. subtilis

<221> CDS

<222> (1)...(555)

<400> 4

gctagcacag actactggca aaattggact gatggggcg gtatagtaaa cgctgtcaat
gggtctggcg ggaattacag tgttaattgg tctaataccg gaaattttgt tgttggtaaa
ggttggacta caggttcgcc atttaggacg ataaactata atgccggagt ttgggcgccg
aatggcaatg gatatttaac tttatatggt tggacgagat cacctctcat agaattattat
gtagtggatt catggggtac ttatagacct actggaacgt ataaaggtag tgtaaaaagt
gatgggggta catatgacat atatacaact acacgttata acgcaccttc cattgatggc
gatcgacta cttttacgca gtactggagt gttcgccagt cgaagagacc aaccggaagc
aacgctacaa tcactttcag caatcatgtg aacgcatgga agagccatgg aatgaatctg
ggcagtaatt gggcttacca agtcatggcg acagaaggat atcaaagtag tggctcgtcg
aatgttaccg tatggtaa

<210> 5

<211> 159

<212> PRT

<213> E. coli

<400> 5

Ala Ile Ser Leu Ile Ala Ala Leu Ala Val Asp Arg Val Ile Gly

1 5 10 15

Asn Glu Asn Ala Leu Pro Trp Asn Leu Pro Ala Asp Leu Ala Trp		
	20	25 30
Phe Lys Arg Asn Thr Leu Asn Lys Pro Val Ile Tyr Gly Arg His		
	35	40 45
Thr Trp Glu Ser Ile Gly Arg Pro Leu Pro Gly Arg Lys Asn Ile		
	50	55 60
Ile Leu Ser Ser Gln Pro Gly Thr Asp Asp Arg Val Thr Trp Val		
	65	70 75
Lys Ser Val Asp Glu Ala Ile Ala Ala Ala Gly Asp Val Pro Glu		
	80	85 90
Ile Phe Val Ile Gly Gly Gly Arg Val Tyr Glu Gln Phe Leu Pro		
	95	100 105
Lys Ala Gln Lys Leu Tyr Leu Thr His Ile Asp Ala Glu Val Glu		
	110	115 120
Gly Asp Thr His Phe Pro Asp Tyr Glu Pro Asp Asp Trp Glu Ser		
	125	130 135
Val Phe Ser Glu Phe His Asp Ala Asp Ala Gln Asn Ser His Ser		
	140	145 150
Tyr Ser Phe Glu Ile Leu Glu Arg Arg		
	155	

<210> 6

<211> 569

<212> DNA

<213> E. coli

<221> CDS

<222> (81)...(560)

<400> 6

ggatccttga caattagtta actatttgtt ataatgtatt catgagctta actaactaat

ccggaaaagg aggaacttcc atggcaatca gtctgattgc ggcgctagcg gtagatcgcg
 ttatcggcaa cgaaaacgcc ctcccatgga acctgcctgc cgatctcgcc tggtttaaac
 gcaacacctt aaataaaccc gtgatttacg ggcgccatac ctgggaatca atcggtaggc
 ctttggcccg ccgcaaaaat attatcctca gcagtcaacc cgggaccgat gatcgggtta
 cctgggttaa atcggtcgac gaagccatcg cggccgcagg tgacgtacca gaaatcttcg
 tgattggcgg cggacgcgtt tatgaacagt tcttgccaaa agcgcaaaag ctttatctga
 cgcatatcga tgcagaagtg gaaggcgaca cccattttcc ggattacgag ccggatgact
 gggaatcggg attcagcgaa ttccacgatg ctgatgcgca gaactcgcat agctattcgt
 tcgaaatcct cgagcgtcgt taaggatcc

<210> 7

<211> 353

<212> PRT

<213>

<400> 7

Ala Ile Ser Leu Ile Ala Ala Leu Ala Val Asp Arg Val Ile Gly

1 5 10 15

Asn Glu Asn Ala Leu Pro Trp Asn Leu Pro Ala Asp Leu Ala Trp

20 25 30

Phe Lys Arg Asn Thr Leu Asn Lys Pro Val Ile Tyr Gly Arg His

35 40 45

Thr Trp Glu Ser Ile Gly Arg Pro Leu Pro Gly Arg Lys Asn Ile

50 55 60

Ile Leu Ser Ser Gln Pro Gly Thr Asp Asp Arg Val Thr Trp Val

65 70 75

Lys Ser Val Asp Glu Ala Ile Ala Ala Ala Gly Asp Val Pro Glu

80 85 90

Ile Phe Val Ile Gly Gly Gly Arg Val Tyr Glu Gln Phe Leu Pro

95 100 105

Lys Ala Gln Lys Leu Tyr Leu Thr His Ile Asp Ala Glu Val Glu		
110	115	120
Gly Asp Thr His Phe Pro Asp Tyr Glu Pro Asp Asp Trp Glu Ser		
125	130	135
Val Phe Ser Glu Phe His Asp Ala Asp Ala Gln Asn Ser His Ser		
140	145	150
Tyr Ser Phe Glu Ile Leu Glu Arg Arg Gly Gly Gly Gly Ser Gly		
155	160	165
Gly Gly Gly Ala Ser Thr Asp Tyr Trp Gln Asn Trp Thr Asp Gly		
170	175	180
Gly Gly Ile Val Asn Ala Val Asn Gly Ser Gly Gly Asn Tyr Ser		
185	190	195
Val Asn Trp Ser Asn Thr Gly Asn Phe Val Val Gly Lys Gly Trp		
200	205	210
Thr Thr Gly Ser Pro Phe Arg Thr Ile Asn Tyr Asn Ala Gly Val		
215	220	225
Trp Ala Pro Asn Gly Asn Gly Tyr Leu Thr Leu Tyr Gly Trp Thr		
230	235	240
Arg Ser Pro Leu Ile Glu Tyr Tyr Val Val Asp Ser Trp Gly Thr		
245	250	255
Tyr Arg Pro Thr Gly Thr Tyr Lys Gly Thr Val Lys Ser Asp Gly		
260	265	270
Gly Thr Tyr Asp Ile Tyr Thr Thr Thr Arg Tyr Asn Ala Pro Ser		
275	280	285
Ile Asp Gly Asp Arg Thr Thr Phe Thr Gln Tyr Trp Ser Val Arg		
290	295	300
Gln Ser Lys Arg Pr Thr Gly Ser Asn Ala Thr Ile Thr Phe Ser		
305	310	315
Asn His Val Asn Ala Trp Lys Ser His Gly Met Asn Leu Gly Ser		

320	325	330
Asn Trp Ala Tyr Gln Val Met Ala Thr Glu Gly Tyr Gln Ser Ser		
335	340	345
Gly Ser Ser Asn Val Thr Val Trp		
350		

<210> 8

<211> 1153

<212> DNA

<213>

<400> 8

ggatccttga caattagtta actatttgtt ataatgtatt catgagctta actaactaat
 ccggaaaagg aggaacttcc atggcaatca gtctgattgc ggcgctagcg gtagatcgcg
 ttatcggcaa cgaaaacgcc ctcccatgga acctgcctgc cgatctcgcc tggtttaaac
 gcaacacctt aaataaaccc gtgatttacg ggcgccatac ctgggaatca atcggtaggc
 ctttgcccgg ccgcaaaaat attatcctca gcagtcaacc cgggaccgat gatcgggtta
 cctgggttaa atcggtcgac gaagccatcg cggccgcagg tgacgtacca gaaatcttcg
 tgattggcgg cggacgcgtt tatgaacagt tcttgccaaa agcgcaaaag ctttatctga
 cgcatatcga tgcagaagtg gaaggcgaca cccattttcc ggattacgag ccggatgact
 gggaatcggg attcagcgaa ttccacgatg ctgatgcgca gaactcgcat agctattcgt
 tcgaaatcct cgagcgtcgt ggtggcggtg gctcgggttg tggcggcgct agcacagact
 actggcaaaa ttggactgat gggggcggtg tagtaaacgc tgtcaatggg tctggcggga
 attacagtgt taattggtct aataccggaa attttgttgt tggtaaagggt tggactacag
 gttcgccatt taggacgata aactataatg ccggagtttg ggcgccgaat ggcaatggat
 atttaacttt atatggttg acgagatcac ctctcataga atattatgta gtggattcat
 ggggtactta tagacctact ggaacgtata aaggctactgt aaaaagtgat ggggtacat
 atgacatata tacaactaca cgttataacg caccttccat tgatggcgat cgcactactt
 ttacgcagta ctggagtgtt cgccagtcga agagaccaac cggaagcaac gctacaatca
 ctttcagcaa tcatgtgaac gcatggaaga gccatggaat gaatctgggc agtaattggg

cttaccaagt catggcgaca gaaggataatc aaagtagtgg ctcgtcgaat gttaccgtat
ggtaaggatc ccc

<210> 9

<211> 353

<212> PRT

<213>

<400> 9

Ala	Ile	Ser	Leu	Ile	Ala	Ala	Leu	Ala	Val	Asp	Arg	Val	Ile	Gly
1				5					10					15
Asn	Glu	Asn	Ala	Leu	Pro	Trp	Asn	Leu	Pro	Ala	Asp	Leu	Ala	Trp
				20					25					30
Phe	Lys	Arg	Asn	Thr	Leu	Asn	Lys	Pro	Val	Ile	Tyr	Gly	Arg	His
				35					40					45
Thr	Trp	Glu	Ser	Ile	Gly	Arg	Pro	Leu	Pro	Gly	Arg	Lys	Asn	Ile
				50					55					60
Ile	Leu	Ser	Ser	Gln	Pro	Gly	Thr	Asp	Asp	Arg	Val	Thr	Trp	Val
				65					70					75
Lys	Ser	Val	Asp	Glu	Ala	Ile	Ala	Ala	Ala	Gly	Asp	Val	Pro	Glu
				80					85					90
Ile	Phe	Val	Ile	Gly	Gly	Gly	Arg	Val	Tyr	Glu	Gln	Phe	Leu	Pro
				95					100					105
Lys	Ala	Gln	Lys	Leu	Tyr	Leu	Thr	His	Ile	Asp	Ala	Glu	Val	Glu
				110					115					120
Gly	Asp	Thr	His	Phe	Pro	Asp	Tyr	Glu	Pro	Asp	Asp	Trp	Glu	Ser
				125					130					135
Val	Phe	Ser	Glu	Phe	His	Asp	Ala	Asp	Ala	Gln	Asn	Ser	His	Ser
				140					145					150
Tyr	Ser	Phe	Glu	Ile	Leu	Glu	Arg	Arg	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly

155	160	165
Gly Gly Gly Ala Ser Thr Asp Tyr Trp Gln Asn Trp Thr Asp Gly		
170	175	180
Gly Gly Ile Val Asn Ala Val Asn Gly Ser Gly Gly Asn Tyr Ser		
185	190	195
Val Asn Trp Ser Asn Thr Gly Asn Phe Val Val Gly Lys Gly Trp		
200	205	210
Thr Thr Gly Ser Pro Phe Arg Thr Ile Asn Tyr Asn Ala Gly Val		
215	220	225
Trp Ala Pro Asn Gly Asn Gly Tyr Leu Thr Leu Tyr Gly Trp Thr		
230	235	240
Arg Ser Pro Leu Ile Glu Tyr Tyr Val Val Asp Ser Trp Gly Thr		
245	250	255
Tyr Arg Pro Thr Gly Thr Tyr Lys Gly Thr Val Lys Ser Asp Gly		
260	265	270
Gly Thr Tyr Asp Ile Tyr Thr Thr Thr Arg Tyr Asn Ala Pro Ser		
275	280	285
Ile Asp Gly Asp Arg Thr Thr Phe Thr Gln Tyr Trp Ser Val Arg		
290	295	300
Gln Ser Lys Arg Pro Thr Gly Ser Asn Ala Thr Ile Thr Phe Ser		
305	310	315
Asn His Val Asn Ala Trp Lys Ser His Gly Leu Asn Leu Gly Ser		
320	325	330
Asn Trp Ala Tyr Gln Val Ile Ala Thr Glu Gly Tyr Gln Ser Ser		
335	340	345
Gly Ser Ser Asn Val Thr Val Trp		
350		

<211> 1153

<212> DNA

<213>

<400>10

ggatccttga caattagtta actatttggtt ataatgtatt catgagctta actaactaat
ccggaaaagg aggaacttcc atggcaatca gtcgtattgc ggcgctagcg gtagatcgcg
ttatcggcaa cgaaaacgcc ctcccatgga acctgcctgc cgatctcgcc tggtttaaac
gcaacacctt aaataaaccc gtgatttacg ggccgcatac ctgggaatca atcggtaggc
ctttgcccgg ccgcaaaaat attatcctca gcagtcaacc cgggaccgat gatcgggtta
cctgggttaa atcggtcgac gaagccatcg cgcccgagcagg tgacgtacca gaaatcttcg
tgattggcgg cggacgcgtt tatgaacagt tcttgccaaa agcgcaaaag ctttatctga
cgcatatcga tgcagaagtg gaaggcgaca cccattttcc ggattacgag ccggtagct
gggaatcggg attcagcgaa ttccacgatg ctgatgcgca gaactcgcat agctattcgt
tcgaaatcct cgagcgtcgt ggtggcggtg gctcgggtgg tggcggcgct agcacagact
actggcaaaa ttggactgat gggggcggtg tagtaaagcg tgtcaatggg tctggcgga
attacagtgt taattggtct aataccggaa attttgttgt tggtaaaggt tggactacag
gttcgccatt taggacgata aactataatg ccggagtttg ggcccggaat ggcaatggat
atttaacttt atatggttgg acgagatcac ctctcataga atattatgta gtggattcat
ggggtactta tagacctact ggaacgtata aaggtactgt aaaaagtgat ggggttacat
atgacatata tacaactaca cgttataacg caccttccat tgatggcgat cgcactactt
ttacgcagta ctggagtgtt cgccagtcga agagaccaac cggaagcaac gctacaatca
ctttcagcaa tcatgtgaac gcatggaaga gccatggact caatctgggc agtaattggg
cttaccaagt catcgcgaca gaaggatata aaagtagtgg ctctcgaat gttaccgtat
ggtaaggatc ccc

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 野性型酵素の活性を保持するとともに、過酸化水素等の酸化に対する抗酸化特性を有する酵素蛋白質、及びその製造方法を提供する。

【解決手段】 酵素蛋白質のL-システイン及びL-メチオニン残基をL-アラニン、L-アスパラギン酸、L-グルタミン酸、L-フェニルアラニン、L-グリシン、L-ヒスチジン、L-イソロイシン、L-リジン、L-ロイシン、L-アスパラギン、L-プロリン、L-グルタミン、L-アルギニン、L-セリン、L-トレオニン、L-バリン、L-チロシン、及びL-トリプトファンの18種類のL-アミノ酸残基に置換することにより、元の酵素蛋白質の活性を保持し耐酸化性有する硫黄原子を含まない酵素タンパク質とする。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	平成 11 年 特許願 第 183664 号
受付番号	59900622652
書類名	特許願
担当官	宇留間 久雄 7277
作成日	平成 11 年 7 月 6 日

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】

000001144

【住所又は居所】

東京都千代田区霞が関 1 丁目 3 番 1 号

【氏名又は名称】

工業技術院長

【指定代理人】

申請人

【識別番号】

220000404

【住所又は居所】

茨城県つくば市東 1-1-3

【氏名又は名称】

工業技術院生命工学工業技術研究所長

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000001144]

1. 変更年月日 1990年 9月20日
[変更理由] 新規登録
住 所 東京都千代田区霞が関1丁目3番1号
氏 名 工業技術院長

THIS PAGE BLANK (USPTO)